

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : **2 743 421**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **96 00121**

(51) Int Cl<sup>6</sup> : G 01 N 33/48, G 01 N 21/84, C 12 Q 1/02, C 12 N 5/08

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 08.01.96.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 11.07.97 Bulletin 97/28.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : ASSOCIATION POUR L'ESSOR DE LA TRANSFUSION SANGUINE DANS LA REGION DU NORD ASSOCIATION LOI DE 1901 — FR et INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM — FR.

(72) Inventeur(s) : RONFARD VINCENT et BARRANDON YANN.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET LEPEUDRY.

(54) PROCEDE POUR L'EVALUATION DE LA MIGRATION DES KERATINOCYTES.

(57) L'invention concerne un procédé pour la mise en évidence de la migration des kératinocytes dans un substrat à base de fibrine. La reproductibilité du test permet de l'utiliser pour l'évaluation de diverses conditions biologiques, chimiques ou physiques sur la capacité migratoire des cellules.

Ce test trouve donc diverses applications en dermatologie et en cosmétologie.

FR 2 743 421 - A1



L'invention concerne un procédé pour la mise en évidence et la mesure de la migration des kératinocytes dans un substrat à base de fibrine. La reproductibilité du test  
5 permet de l'utiliser pour l'évaluation de diverses conditions biologiques, chimiques ou physiques sur la capacité migratoire des cellules.

Les kératinocytes représentent plus de 90 % des cellules de l'épiderme humain. Le renouvellement permanent de  
10 l'épiderme est assuré par les kératinocytes situés dans la couche basale. Dès qu'ils ont quitté celle-ci, ils perdent la capacité de se diviser et ils se différencient pour former la couche cornée. Au contact de glycoprotéines de la membrane basale, les kératinocytes établissent des structures  
15 d'adhérence forte (les hémidesmosomes) qui les rendent immobiles latéralement. Par contre en cas de réépithélialisation de plaies, les kératinocytes basaux entrent en contact avec d'autres molécules comme la fibronectine, le collagène, la thrombospondine... qui  
20 induisent une importante mobilité latérale de ces kératinocytes et favorisent ainsi la cicatrisation.

Différentes techniques sont utilisées pour étudier la migration cellulaire : - l'observation au microscope couplé à une caméra vidéo permet de suivre le déplacement des  
25 cellules de manière continue (le procédé est coûteux et nécessite un matériel complexe comprenant un mini-incubateur à CO<sub>2</sub> placé sous un microscope équipé d'une caméra).

- la mesure de la migration à partir d'explants insérés dans des gouttes d'agarose ("agarose drop  
30 explant") ou dans des "chambres de Boyden" (migration au travers de membranes poreuses) ne permettent qu'une évaluation collective de migration et de prolifération cellulaires.

- le déplacement individuel de cellules a été observé sur des lamelles de verre recouvertes  
35 de particules d'or colloïdal, avec des cellules 3T3 (G.Albrecht-Buehler - Cell 11, 1977, 395) : les cellules migrent en ingérant les particules d'or, ce qui laisse une

trace visible de leur déplacement (après fixation au formaldéhyde, les cellules sont photographiées au microscope en champ noir ; les traces de migrations apparaissent en noir dans le champ brillant de particules d'or) ; ce test a reçu le  
5 nom de "phagokinetic track assay". Il a pu être reproduit avec des kératinocytes à condition de recouvrir la couche d'or colloïdal d'une matrice de collagène IV (Y.Ando et P.J.Jensen J.Invest Dermatol.100,1993,633). Ce test permet d'étudier l'influence de divers facteurs de croissance, cytokines ou  
10 hormones sur la migration des cellules.

La Demanderesse a mis au point un nouveau procédé d'observation de la migration des kératinocytes dans des conditions plus physiologiques que celles décrites précédemment (c'est à dire sans phagocytose de particules  
15 d'or) et plus particulièrement en situation proche de celle de la réépithélialisation d'une blessure.

Quand une blessure cutanée se produit, le premier événement qui intervient est la formation d'un caillot de fibrine dont la fonction est d'arrêter le saignement. Ensuite  
20 les kératinocytes migrent sous ce caillot, à partir de la couche basale des bords de la blessure.

Par analogie avec ce mécanisme, la Demanderesse a déjà décrit (brevets FR 2 639 958 et EP 0 373 044) l'utilisation d'un support à base de fibrine pour la culture  
25 de kératinocytes, ladite culture étant directement utilisable comme greffon. Dans ce système, la présence d'une antiprotéase, en particulier l'aprotinine, est indispensable pour empêcher la dégradation du substrat de fibrine par les protéases des cellules et du sérum.

30 La Demanderesse a maintenant montré que le même substrat, mais dépourvu d'aprotinine, permet d'observer la migration des kératinocytes, inoculés à faible densité cellulaire (environ  $10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) en présence d'une faible quantité de sérum.

35 Dans des conditions identiques, les fibroblastes du derme humain ne présentent aucune mobilité.

Le comportement des kératinocytes n'est pas homogène

- une fraction des cellules (65 %) est immobile ou présente un déplacement inférieur au diamètre d'une cellule,
- l'autre fraction des cellules (35 %) se déplace en dégradant le substrat de fibrine et en y laissant l'empreinte de son passage, plus particulièrement sous forme de galeries cylindriques ou hélicoïdales. Le diamètre de ces galeries est assez constant : en moyenne 19-20  $\mu\text{m}$ , soit un peu plus d'un diamètre cellulaire (12-15  $\mu\text{m}$ ).

La plupart des kératinocytes en migration ont un aspect sphérique et leur mouvement comprend une rotation, soit dextrogyre soit lévogyre (en moyenne 50 % de chaque type), comme on peut l'observer sur les photographies des empreintes dans la fibrine.

En absence de sérum, les kératinocytes ne migrent pas. Le sérum apporte probablement la quantité de plasminogène (qui sera activé en plasmine) nécessaire à la dégradation de la fibrine en présence des protéases cellulaires.

La Demanderesse a tiré parti de ce phénomène pour mettre au point un procédé d'évaluation de la migration des kératinocytes à la fois simple, rapide et ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué, et qui permet ainsi d'étudier l'effet de divers facteurs ajoutés au milieu de culture des cellules ainsi que de diverses conditions physiques, biologiques ou chimiques. Ce test est ainsi particulièrement avantageux pour des études à but dermatologique ou cosmétologique.

Le procédé selon l'invention comprend :

- l'utilisation de plaques multipuits pour cultures de cellules ou de lamelles pour observation microscopique, recouvertes d'une fine couche transparente de fibrine réticulée en présence de thrombine ;
- l'utilisation, pour former ladite couche de fibrine, d'un concentré de fibrinogène approprié pour former une colle biologique, dépourvu d'antiprotéase exogène ;
- l'inoculation des kératinocytes à très faible densité cellulaire, de préférence de l'ordre de  $10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$  ;
- l'incubation en milieu de culture pour kératinocytes

additionné de 1 à 10 % de sérum, en absence d'antiprotéase exogène (en particulier en absence d'aprotinine), pendant 18 à 24 heures à 37°C ;

5 - l'élimination du milieu de culture et la fixation des kératinocytes au formaldéhyde ;

- l'observation au microscope, éventuellement après photographie, d'un nombre de champs statistiquement significatif et le comptage des kératinocytes ayant migré et l'évaluation de la longueur de l'empreinte de leur migration.

10 Le procédé selon l'invention peut être utilisé avantageusement pour étudier l'effet sur la migration des kératinocytes :

- de facteurs physiologiques comme les hormones, les cytokines ou toute molécule susceptible d'en influencer le métabolisme ;

15 - de molécules d'intérêt thérapeutique du type des facteurs favorisant la cicatrisation ;

- de molécules d'intérêt cosmétologique comme des facteurs de protection contre les rayonnements, la température ou toute condition physique ou chimique délétère pour l'épiderme.

20 Le procédé selon l'invention peut aussi être utilisé pour étudier l'effet de conditions physiques, chimiques ou biologiques (comme le contact avec des cellules nourricières) susceptibles d'affecter le métabolisme des kératinocytes.

25 Le procédé selon l'invention peut encore être utilisé pour étudier l'état biologique des kératinocytes afin de diagnostiquer tout état pathologique comme une déficience en facteur de cicatrisation ou un état de transformation néoplasique.

30 La mise en oeuvre du procédé pour l'évaluation de différentes conditions de culture sera mieux comprise dans les exemples qui suivent. Ceux-ci ne constituent pas une limitation de la portée de l'invention.

La figure 1 est décrite dans l'exemple I,3.

35 Exemple I - Mise au point du test. Choix des cellules.

1. Préparation du substrat.

Le substrat de fibrine réticulée est préparé à

partir d'une préparation commerciale de colle biologique (connue sous le nom de Biocol®-Thrombine). Le concentré de fibrinogène lyophilisé de cette préparation est un concentré de protéines plasmatiques humaines comprenant plus de 70 % de fibrinogène, du Facteur XIII et de la fibronectine (EP 0 305 243). La quantité lyophilisée dans un flacon de 5 ml est reconstituée dans 10,8 ml d'eau bidistillée stérile. La thrombine humaine lyophilisée, dosée à 500 U NIH/ml est diluée avec du sérum physiologique pour obtenir une concentration finale de 5 à 10 U/ml. Les deux composants sont reconstitués en moins de 15 minutes à température ambiante ; ils sont injectés simultanément sur le fond des puits de culture (plaque multipuits pour culture cellulaire, distribuée par exemple par Nunc®) à l'aide du mélangeur fourni dans la trousse de Biocol®-thrombine. Chaque puits de culture de 35 mm de diamètre reçoit 0,25 ml de chacun des deux constituants. En quelques minutes il se forme un réseau uniforme de fibrine transparente, prête à l'emploi, d'une épaisseur moyenne de 50 à 100  $\mu$ m.

## 2. Cellules.

Les kératinocytes proviennent d'une culture fraîchement préétablie. Des kératinocytes provenant de différentes parties du corps (16 prélèvements) ont été utilisés entre les passages 2 et 7, avec des résultats semblables, indépendamment de l'âge du donneur. Par contre des cellules primaires (fraîchement isolées et non établies en culture) ne présentent qu'une capacité de migration très faible dans la fibrine.

Les cultures de kératinocytes trypsinisées et diluées en milieu de culture sont ensemencées à une densité de  $10^3$  cellules par puits de 35 mm de diamètre. Elles sont incubées à 37°C en milieu de culture contenant 10 % de sérum foetal bovin, en absence d'antiprotéase exogène et en absence de couche nourricière de cellules 3T3.

## 3. Observation de la migration des cellules.

Après 24 heures d'incubation à 37°C, le surnageant des cultures est jeté et les cellules adhérentes au substrat

sont fixées avec une solution à 3,7 % de formaldéhyde pour être observées au microscope. On utilise un objectif de grossissement 10. Des mesures statistiquement valables sont obtenues par observation de 18 champs microscopiques pris au  
5 hasard (6 champs par boîte et 3 boîtes par condition expérimentale, c'est-à-dire pour un point sur un graphique).

Quand on applique le test à l'évaluation du rôle d'un facteur de croissance (ou toute autre molécule), celui-ci est additionné dans le milieu de culture des cellules, sans  
10 période de préincubation.

Un résultat typique après 24 heures d'incubation est présenté sur la figure 1 :

la photo A montre un fibroblaste humain  
les photos B et C montrent un kératinocyte immobile  
15 et un très peu mobile  
les photos D à F montrent des kératinocytes très mobiles.

En particulier la photo F montre l'empreinte hélicoïdale régulière laissée dans la fibrine par la migration de la  
20 cellule.

#### Exemple II - Reproductibilité du test.

4 lots de Biocol® ont été utilisés et les kératinocytes d'une culture préétablie ont été ensemencés,  
25 comme décrit plus haut, et incubés à 37°C pendant 24 heures. La proportion de cellules mobiles est similaire pour les 4 lots :

	lots de Biocol®	% de cellules mobiles
30	0730	23
	0960	31
	0830	28
	0870	30
		moyenne : 28 %

35

Avec un type cellulaire choisi la reproductibilité du test est excellente et permettra donc d'analyser l'influence de divers

facteurs physiques ou chimiques.

### Exemple III - Variabilité de la migration cellulaire

Différents types de kératinocytes migrent plus ou moins fort, mais au sein d'une lignée le pourcentage de cellules qui migrent est bien reproductible.

3 lignées de kératinocytes ont été testées au quatrième et cinquième passages en culture, dans les conditions décrites plus haut.

10

Culture (code de laboratoire)	% de cellules mobiles (moyenne de 7 expériences)
YF29 V	44
YE1 IV	31
AFL1 IV	14

15

De manière surprenante, on a observé que des kératinocytes immortalisés ou néoplasiques (provenant de carcinomes à cellules squameuses) ont pratiquement perdu leur capacité migratoire. Cette observation peut être corrélée à la faible tendance métastatique de ces cellules. Cette observation souligne l'intérêt diagnostique potentiel du test selon l'invention.

20

### Exemple IV - Etat de différenciation des kératinocytes

Les kératinocytes ont été ensemencés sur le substrat de fibrine à partir d'une même culture établie depuis 5, 6, 7 et 10 jours. On constate que la mobilité des kératinocytes est inversement proportionnelle à l'âge de la culture

30

jours de culture de YF29 V	% de cellules mobiles
5	50
6	35
7	18
10	5

35



D'autre part, on observe que des kératinocytes fraîchement isolés ne migrent pas et ne dégradent pratiquement pas la fibrine pendant les 2 premiers jours suivant la mise en culture.

5 48 heures plus tard leur migration est de 6µm/heure et après quelques passages en culture, leur migration est de 48µm/heure. Ce résultat coïncide avec l'observation, in vivo, du début de la cicatrisation d'une blessure après plus d'un jour, les cellules devant passer du stade "établies" à un  
10 stade "hyperprolifératif".

Exemple V - Mise en évidence de l'effet des facteurs de croissance

15 Différentes souches de kératinocytes ont été ensemencées sur le substrat de fibrine avec ou sans apport d'EGF ("epidermal growth factor") à 10 ng/ml. La proportion moyenne de cellules mobiles est doublée en présence d'EGF (moyenne de 3 expériences) :

20	souches	% de cellules mobiles	
		sans EGF	avec EGF
	YF 29	34	69
	YE 1	26	47
	AFL 1	14	51

25 De plus la proportion de cellules mobiles augmente avec la concentration d'EGF.

Dans un test réalisé avec des kératinocytes provenant d'une culture jeune, non conflente, on a observé le résultat suivant :

30	concentration en EGF (ng/ml)	% de kératinocytes mobiles
	0	21
	0,1	43
	1	55
35	10	61
	100	66

De plus l'EGF augmente la vitesse de migration parce que la longueur des empreintes dans la fibrine est significativement plus longue.

5

Exemple VI - Mise en évidence d'effets négatifs sur la migration.

Le même test permet d'étudier l'effet inhibiteur de certains facteurs sur la migration des kératinocytes.

10

A titre d'exemple on a mesuré la migration (en présence et en absence d'EGF) en présence de 3 concentrations de thrombine :

15	thrombine UI/ml	% de kératinocytes mobiles	
		sans EGF	avec EGF
	0	36	54
	10	28	47
	30	11	24
	100	12	24

20

La thrombine inhibe la mobilité ; cet effet est moins marqué en présence d'EGF.

## REVENDEICATIONS

1- Procédé pour l'évaluation de la migration des kératinocytes, caractérisé en ce qu'il comprend l'observation  
5 au microscope de l'empreinte créée par la migration cellulaire dans un substrat à base de fibrine réticulée, après inoculation des kératinocytes à faible densité cellulaire et incubation en milieu de culture additionné de sérum et dépourvu d'antiprotéase exogène.

10 2- Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend l'utilisation, pour former la couche de fibrine, d'un concentré de fibrinogène d'origine plasmatique approprié pour former une colle biologique en présence de thrombine, dépourvu d'antiprotéase exogène.

15 3- Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend

- l'utilisation de plaques multipuits pour cultures de cellules ou de lamelles pour observation microscopique, recouvertes d'une fine couche transparente de fibrine  
20 réticulée en présence de thrombine ;

- l'inoculation des kératinocytes à très faible densité cellulaire, de préférence de l'ordre de  $10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$  ;

25 - l'incubation en milieu de culture pour kératinocytes additionné de 1 à 10 % de sérum, en absence d'antiprotéase exogène (en particulier en absence d'aprotinine), pendant 20 à 24 heures à  $37^\circ\text{C}$  ;

- l'élimination du milieu de culture et la fixation des kératinocytes au formaldéhyde ;

30 - l'observation au microscope, éventuellement après photographie, d'un nombre de champs statistiquement significatif et le comptage des kératinocytes ayant migré et l'évaluation de la longueur de l'empreinte de leur migration.

35 4- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour étudier l'effet sur la migration des kératinocytes de facteurs physiologiques comme les hormones, les cytokines ou toute molécule susceptible d'en influencer le

métabolisme.

5- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour étudier l'effet sur la migration des kératinocytes de molécules d'intérêt thérapeutique du type des  
5 facteurs favorisant la cicatrisation.

6- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour étudier l'effet sur la migration des kératinocytes de molécules d'intérêt cosmétologique comme des facteurs de protection contre les rayonnements, la température  
10 ou toute condition physique ou chimique délétère pour l'épiderme.

7- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour étudier l'effet de conditions physiques chimiques ou biologiques susceptibles d'affecter le  
15 métabolisme des kératinocytes.

8- Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour étudier l'état biologique des kératinocytes afin de diagnostiquer tout état pathologique comme une déficience en facteur de cicatrisation ou un état de  
20 transformation néoplasique.

1 / 1

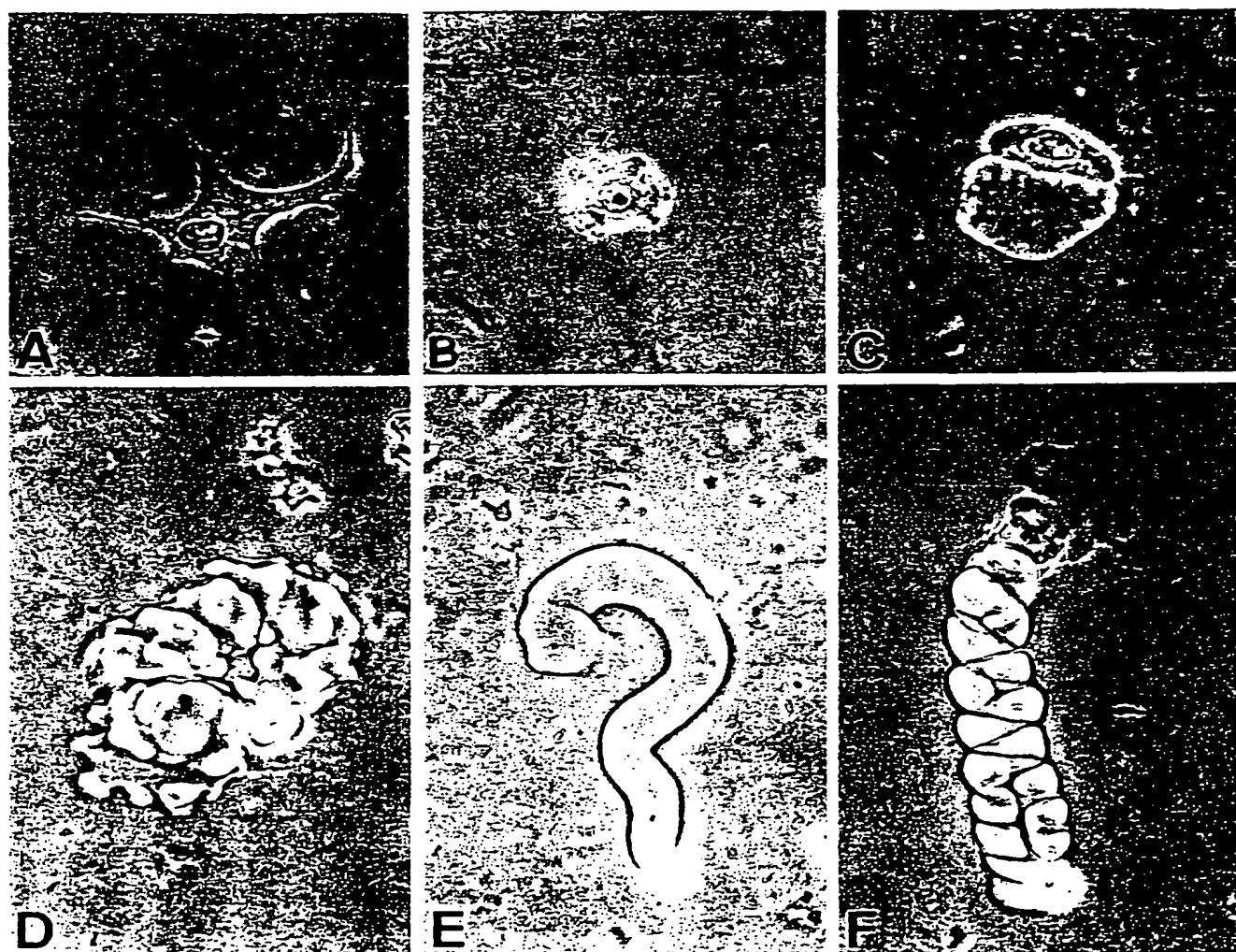


FIG. 1

BEST AVAILABLE COPY

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la rechercheN° d'enregistrement  
nationalFA 523063  
FR 9600121

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,A	JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 100, no. 5, 1 Mai 1993, NEW YORK, NY, pages 633-639, XP000195880 ANDO ET AL: "EPIDERMAL GROWTH FACTOR AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I ENHANCE KERATINOCYTE MIGRATION" * page 635, colonne de gauche *	1,3,5-7
D,A	EP-A-0 373 044 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION) 13 Juin 1990 * abrégé *	2
A	US-A-4 359 527 (ZETTER BRUCE R) 16 Novembre 1982 * abrégé *	8
A	CELL ADHESION AND COMMUNICATION, vol. 2, 1994, pages 299-308, XP000196368 DONALDSON ET AL.: "Further studies on the interaction of migrating keratinocytes with fibrinogen" -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		G01N C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
24 Septembre 1996		Ceder, 0
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant		

2

EPO FORM 1503 03.82 (P/MC11)